Aus dem Institut für Klinische Chemie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. H.-J. Dulce
und dem
Fachbereich III der Technischen Fachhochschule Berlin
Leiter des Chemielabors: Professor Dr. B. Contag

ÜBER DAS ADSORPTIONSVERHALTEN KRISTALLINER CANCEROGENE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulrike Bogatu, geb. Contag
aus Halberstadt

1974

Aus dem
Institut für Klinische Chemie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. H.-J. Dulce
und dem
Fachbereich III der Technischen Fachhochschule Berlin
Leiter des Chemielabors: Professor Dr. B. Contag

Über das Adsorptionsverhalten kristalliner Cancerogene

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulrike Bogatu, geb. Contag
aus Halberstadt

Referent: Professor Dr. H.-J. Dulce

Korreferent: Frau Professor Dr. Köhler

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 11. März 1974

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

Seite

I. EINFÜHRUNG 4

II. BESPRECHUNG DER LITERATUR 4

III. VERSUCHE 11

A. Epitaxie 11

1. Material und Methode 11

2. Ergebnisse 12

B. Adsorption der Ribonuclease 21

1. Material und Methode 21

2. Ergebnisse 22

C. Hemmung der Ribonuclease-Aktivität durch Adsorption an Cancerogenen 24

1. Material und Methode 24

2. Ergebnisse 25

IV. DISKUSSION 26

V. ZUSAMMENFASSUNG 29

VI. LITERATURVERZEICHNIS 30

I. EINFÜHRUNG

Nach einer Arbeitshypothese von B.CONTAG [1] soll bei der Primärreaktion der Krebsentstehung durch kristalline, wasserunlösliche chemische Noxen eine strukturgelenkte spezifische Adsorption von Zellbestandteilen von Bedeutung sein.

Um diese Vorstellung von einer gerichteten spezifischen Adsorption zu veranschaulichen, und um eventuell Hinweise über die Art der Reaktionspartner zu erhalten, wurden Epitaxie-Versuche mit biogenen Materialien und Cancerogenen durchgeführt

Spezielle Strukturanalogien zwischen den Cancerogenen und dem Enzym Ribonuclease ließen es uns sinnvoll erscheinen, dieses Enzym auf sein Adsorptionsverhalten gegenüber den verschiedensten cancerogenen Festkörpern zu prüfen.

II. BESPRECHUNG DER LITERATUR

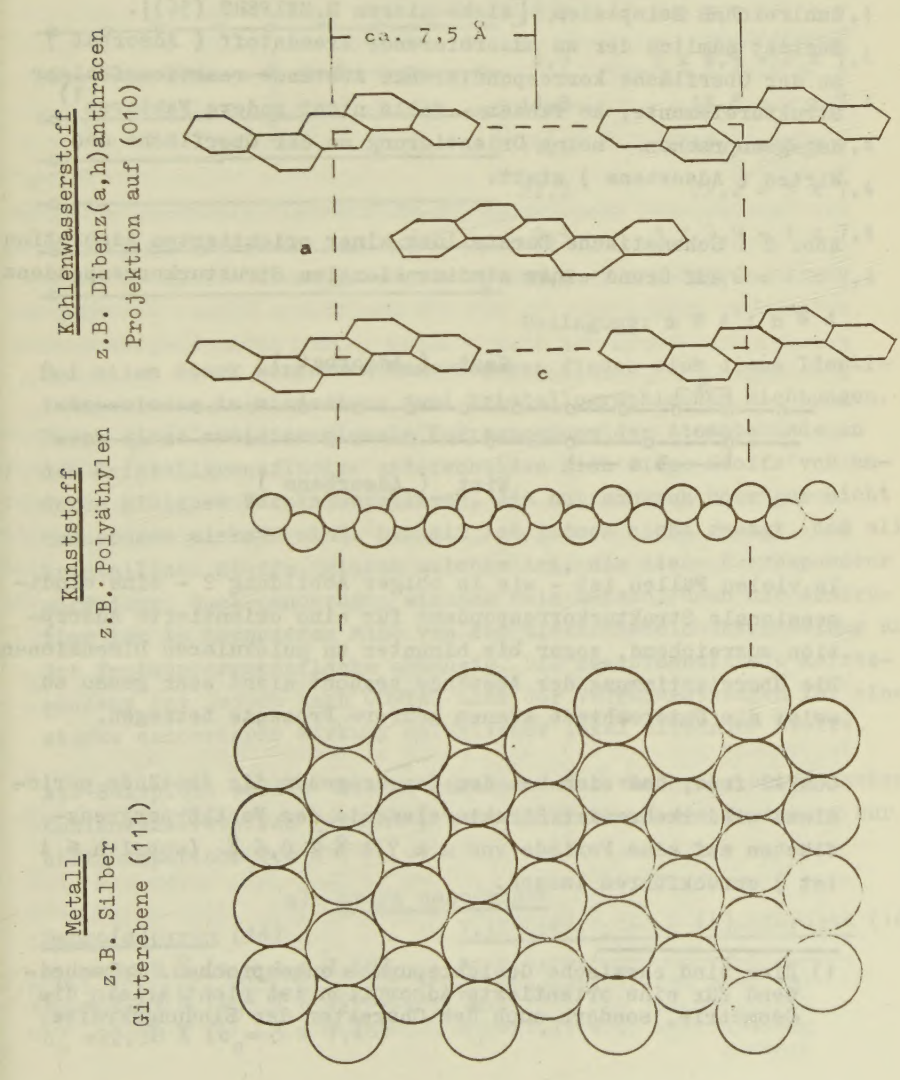
Unseren Untersuchungen liegt eine bisher unveröffentlichte Krebsentstehungstheorie von B.CONTAG zugrunde, die hier zunächst erläutert werden soll. CONTAG stellte im Rahmen einer Untersuchungreihe über vergleichbare Eigenschaften chemischer Cancerogene fest, daß wasserunlösliche Cancerogene (Kohlenwasserstoffe, Kunststoffe, Silikate, Metalle) vergleichbare Strukturmerkmale aufweisen. Im Tierversuch werden diese lokal wirkenden Cancerogene entweder als Festkörper (Folien oder Pulver) implantiert oder werden im Falle der Kohlenwasserstoffe nach Applikation in Form von Lösungen (z.B. in Aceton) im Gewebe zum großen Teil kristallin abgeschieden.

Die Oberflächen dieser Festkörper weisen eine strukturelle Gemeinsamkeit auf, d.h. die Anordnung der reaktionsfähigen Atome oder Moleküle an der Oberfläche ist vergleichbar (Siehe hierzu Abbildung 1).

---

1) Prof.Dr. Bodo Contag
Technische Fachhochschule Berlin

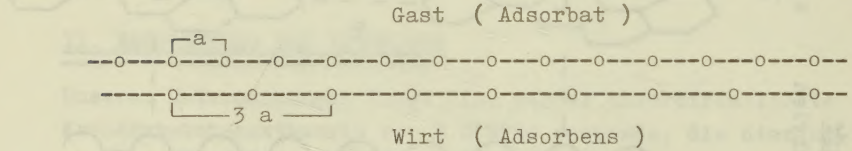
Abb. 1 : Korrespondierende Abstände an den Grenzflächen verschiedener Cancerogene.



Durch diese vergleichbare Anordnung der Strukturelemente ist eine gerichtete und damit spezifische Adsorption von Stoffen möglich, die korrespondierende Strukturparameter aufweisen.

Diese Erscheinung der orientierten Adsorption kennt man aus zahlreichen Beispielen [siehe hierzu H.SEIFERT (36)]. Besitzt nämlich der zu adsorbierende Fremdstoff (Adsorbat) an der Oberfläche korrespondierende Abstände reaktionsfähiger Strukturelemente, so findet - falls nicht andere Faktoren[1)] dagegensprechen - seine Orientierung an der Oberfläche des Wirtes (Adsorbens) statt.

Abb. 2 : Schematische Darstellung einer orientierten Adsorption auf Grund einer eindimensionalen Strukturkorrespondenz.



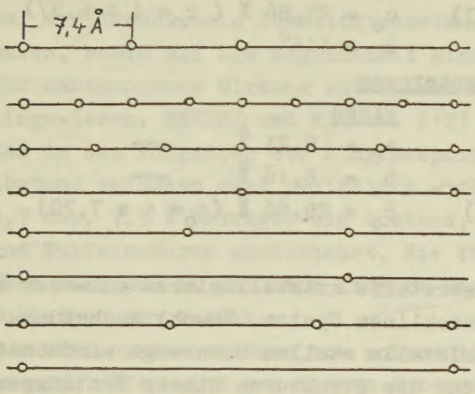
In vielen Fällen ist - wie in obiger Abbildung 2 - eine eindimensionale Strukturkorrespondenz für eine orientierte Adsorption ausreichend, sogar bis hinunter zu molekularen Dimensionen. Die Übereinstimmung der Abstände braucht nicht sehr genau zu sein; die Unterschiede können mehrere Prozente betragen.

CONTAG fand, daß sich bei den Cancerogenen die Abstände periodisch wiederkehrender Strukturelemente der Festkörpergrenzflächen auf eine Periode von n x 7,4 Å ± 0,6 Å (wobei n ≦ 4 ist) zurückführen lassen.

---

1) Hier sind chemische Gesichtspunkte angesprochen. Entscheidend für eine orientierte Adsorption ist nicht allein die Geometrie, sondern auch der Charakter der Bindungskräfte.

Im folgenden sind die möglichen Abstände dargestellt, die mit der von CONTAG für bedeutungsvoll erachteten Identitätsperiode von 7,4 Å korrespondieren.



Atomabstände 7,4 Å	korrespondierende Abstände m x a = n x 7,4
3,7	2 x 3,7 = 1 x 7,4
4,9	3 x 4,9 = 2 x 7,4
14,8	14,8 = 2 x 7,4
11,1	2 x 11,1 = 3 x 7,4
22,2	22,2 = 3 x 7,4
9,9	3 x 9,9 = 4 x 7,4
29,6	29,6 = 4 x 7,4

Bedingung: $m \leqq 4$; $n \leqq 4$

Bei allen stark wirksamen Cancerogenen finden sich diese Identitätsperioden in mindestens zwei kristallographischen Richtungen. Durch diese zweidimensionale Korrespondenz der Atomabstände an den Kristallgrenzflächen unterscheiden sich diese Stoffe von anderen gleicher Verbindungsklasse, die nur schwach oder gar nicht cancerogen wirksam sind. Hiermit ist jedoch nicht gesagt, daß alle kristallinen Stoffe, gleich welcher Art, die diese Korrespondenz aufweisen, auch cancerogen wirksam sein müssen, denn die Adsorption ist in besonderem Maße von der Elektronendichteverteilung an der Festkörpergrenzfläche abhängig. Die zweidimensionale Korrespondenz ist jedoch nach CONTAG eine der Vorraussetzungen für eine starke cancerogene Wirkung unlöslicher lokal wirkender Stoffe.

Als Beispiele werden die Gitterkonstanten von sechs aromatischen Kohlenwasserstoffen genannt ; dazu in Klammern die Beziehung zur Abstandsperiode 7,4 Å .

a) stark cancerogen

Benzo(a)pyren (14)	7,12-Dimeth[illegible]-benz(a)anthracen (16)
a_o = 7,59 Å (a_o= 1 x 7,59)	a_o = 8,[illegible] Å [illegible]
b_o = 7,69 Å (b_o= 1 x 7,69)	b_o = 7,[illegible] Å [illegible] ,32)
c_o =22,38 Å (c_o= 3 x 7,46)	c_o =21,11 Å ([illegible] x ,04)

Dibenz(a,h)anthracen (31)

a_o = 8,22 Å ---

b_o = 11,39 Å ($2b_o$ = 3 x 7,59)

c_o = 15,14 Å (c_o = 2 x 7,57)

3-Methylcholanthren (15)

a_o = 4,90 Å ($3a_o$ = 2 x 7,23)

b_o = 11,34 Å ($2b_o$ = 3 x 7,56)

c_o = 27,86 Å (c_o = 4 x 6,97)

ß = 116°

b) nicht cancerogen

Phenanthren

a_o = 8,46 Å ---

b_o = 6,16 Å ---

c_o = 9,47 Å ($3c_o$ = 4 x 7,10)

ß = 97,7°

Picen

a_o = 8,21 Å ---

b_o = 6,16 Å ---

c_o = 28,80 Å (c_o = 4 x 7,20)

Die cancerogenen Kohlenwasserstoffe kristallisieren entweder im orthorhombischen oder im monoklinen System. Sowohl Wachstums- als auch Spaltflächen dieser Kristalle stellen bevorzugt einfachst indizierte Ebenen dar, so daß die Strukturen dieser Festkörpergrenzflächen durch die Atomabstände in den kristallographischen Richtungen gebildet werden.

Die nach diesen Befunden von CONTAG aufgestellte " Matrizentheorie " [1] besagt, daß gewisse Zellbestandteile auf Grund korrespondierender Strukturen an der Oberfläche der kristallinen Cancerogene adsorbiert werden und daß eine hieraus resultierende Funktionsänderung die krebsige Entartung der Zelle einleitet. Die Oberflächen der Cancerogene werden also als eine Art " Matrize " angesehen für die orientierte Adsorption von Gewebsbestandteilen.

Wie CONTAG feststellen konnte, ist die eindimensionale Matrize nur in Ausnahmefällen cancerogen wirksam (scheibchenförmige Implantate und n = 1). Alle stark wirksamen Cancerogene besitzen mindestens eine zweidimensionale Matrize der definierten Art, d.h. die Abstände periodisch wiederkehrender Strukturelemente einer Kristallgrenzfläche korrespondieren mit der oben angegebenen Identitätsperiode in zwei etwa senkrecht aufeinander stehenden Richtungen. Hierdurch wird diese Matrize

---

1) Der Name Matrizentheorie wurde von H.SEIFERT (35) für seine Kausaltheorie der Silikose geprägt und, da es sich hier um gleichartige Oberflächenphänomene handelt, von CONTAG übernommen.

sehr spezifisch, und man kann erwarten, daß das biogene Adsorbat eine vergleichbare Grenzflächenstruktur aufweist.

Auf eindimensionale Identitätsabstände in molekularen Strukturen, sowie auf die Möglichkeit einer Strukturabhängigkeit der cancerogenen Wirkung wurde auch schon von mehreren Autoren hingewiesen. HENDRY und Mitarb. (12) machen darauf aufmerksam, daß in den Polymeren der Äthylenepoxyde und Äthylenimine der Abstand zwischen zwei periodisch wiederkehrenden Gruppen etwa 3,7 bzw. 7,5 Å beträgt, ein Abstand, der auch in den Proteinen und Nukleinsäuren wiederkehrt. Sie führen daher die cancerogene Wirksamkeit auf eine lineare Bindung von Proteinen oder Nukleinsäuren zurück.
Der Wirkungsmechanismus von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen wird von diesen Autoren in einer Mizellenbildung mit einem Molekülabstand von 3,7 bzw. 7,5 Å gesehen. Diese Anschauung deckt sich mit der Vorstellung von CONTAG, denn die Anordnung der Moleküle in den Kristallen der Kohlenwasserstoffe ist mit der von HENDRY und Mitarb. dargestellten Mizellenstruktur vergleichbar.
Auch DRUCKREY und SCHMÄHL (6) diskutieren einen derartigen Wirkungsmechanismus und meinen, daß lineare Zellproteine, die in geeigneter Orientierung mit einer Kunststoff- oder Silikatoberfläche in genügend engen Kontakt kommen, z.B. durch Wasserstoffbrückenbindungen sehr fest gebunden werden können, und daß auf diese Weise die krebsige Entartung von Zellen bewirkt wird.

H.SEIFERT (35) postuliert für die Entstehung der Silikose einen ebensolchen primären Wirkungsmechanismus, wie CONTAG für die Cancerogenese. Nach SEIFERT beruht nämlich die Pathogenität silikogener Stäube auf für den Organismus anomaler Anregung spezifischer Adsorption. Wie er dargestellt hat, bieten die Kristallgrenzflächen des Quarzes den biogenen Makromolekülen strukturanaloge Muster in der Dimensionierung aktiver Gruppen an.

DRUCKREY und SCHMÄHL (6) äußerten schon 1952 die Vermutung, daß der für die Silikose als wahrscheinlich angesehene Wirkungsmechanismus auch für die Beurteilung der cancerogenen Wirkung von Asbest und von Kunststoffen zu diskutieren sei. Die genannten Autoren haben durch Implantation chemisch reiner Kieselsäure Sarkome erzeugen können (8). Auch KAHLAU (17) kommt zu dem Ergebnis, daß die Kieselsäure eine schwach cancerogene Wirkung besitzt, diese aber sehr schwer mit den statistischen Erfahrungen in Einklang zu bringen sei.
DRUCKREY (9) : " Die Erfahrung, daß Patienten mit Silikose selten Lungenkrebs bekommen, erklärt sich wohl zwanglos daraus, daß sie an ihren Kreislaufstörungen zugrunde gehen, bevor eine Krebsentwicklung möglich ist. " Statistische Untersuchungen hierzu liefert GROSSE (11).
Nach CONTAG besitzt Quarz ebenso wie Talk, Asbest und Glimmer zweidimensionale spezielle Matrizen.

Silikatgläser weisen ebenso wie Kunststoffe eindimensionale spezielle Matrizen molekularer Größenordnungen auf. Ihre cancerogene Wirksamkeit ist von Größe und Form des Implantats abhängig (7,8,21-26). Dieser Sachverhalt läßt den Schluß zu, daß eine Behinderung des Stoffwechsels die cancerogene Wirksamkeit verstärkt.

SEIFERT hat seine Oberflächenaktivitätstheorie der Silikose durch Versuche zu stützen versucht. Er konnte an Hand von Epitaxie-Versuchen die Richtwirkung von Quarz auf die Aminosäuren Glycin, Alanin, Oxyprolin und p-Aminobenzoesäure nachweisen (34,35). Seine Versuche auch noch auf andere Silikate ausdehnend, konnte er orientierte Aufwachsungen von Aminosäuren auf Spaltflächen von Glimmer, Talk und Pyrophyllit erzeugen (34).

MÜLLER-BUSCHMANN (20) zeigte, daß lineare Makromoleküle (Polyacrylnitril) orientiert an Kristallflächen des Quarzes adsorbiert werden können.

III. VERSUCHE

A. Epitaxie

Unsere Aufgabe bestand darin, die molekularen Grenzflächenprozesse, wie sie der Matrizentheorie zugrunde liegen, experimentell zu veranschaulichen. Wir wählten hierfür - wie SEIFERT im Rahmen seiner Silikoseforschung - die Erzeugung orientierter Kristallaufwachsungen (Epitaxie), denn die orientierte Kristallisation ist eine Folge der orientierten Adsorption molekularer Keime auf den Grenzflächen des Partners. Dadurch wird es möglich, die auf molekularer Ebene erfolgte Orientierung sichtbar zu machen. Wir hatten die Hoffnung, Hinweise über die Art des biogenen Reaktionspartners beim Primärvorgang der Cancerogenese zu erhalten.

1. Material und Methode

Aufwachsungspartner:

a) Cancerogene Stoffe: Dibenz(c,h)acridin, Dibenz(a,j)acridin, 7-Methylbenz(a)anthracen, 12-Methylbenz(a)anthracen, Benzo(a)pyren, Chrysen, Glimmer, Polyamid 6.6.

b) Biogene Stoffe: Glycin, L(+)-Glutaminsäure, L(+)-Alanin, L-Prolin, Lactose, D-Galactose, D-Arabinose, L-Arabinose, DL-Arabinose.
Als Vertreter der biogenen Stoffe wurden die genannten Aminosäuren und Zuckerarten gewählt, da diese im Gegensatz zu den in diesem Zusammenhang interessanteren makromolekularen Stoffen leicht kristallisieren.

Experimentell wurden zwei Verfahren gewählt:

a) Sublimation von Aminosäuren bei 160 bis 190° C unter vermindertem Druck (15 Torr) und Kristallisation auf cancerogenen Stoffen.

b) Kristallisation der Kohlenwasserstoffe aus acetonischer Lösung auf Wachstumsflächen der Aminosäure- und Zuckerkristalle. Die Kristalle der Aminosäuren und Zucker wurden aus wäßrigen Lösungen erhalten.

2. Ergebnisse

In den zahlreichen Kombinationen konnten in einigen Fällen charakteristische Kristallorientierungen beobachtet werden.

Die Ergebnisse unserer Versuche sind in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Tab. 1 : Ergebnisse der Epitaxie-Versuche.
Die Gastkomponente wurde aus der Lösung oder aus der Gasphase (Sublimation) auf der Wirtskomponente zur Kristallisation gebracht (siehe Text).
Zeichenerklärung: + gerichtete Kristallisation
- ungeordnete Kristallisation

GAST \ WIRT	Lactose	D-Arabinose	L-Arabinose	DL-Arabinose	D-Galactose	Glycin	L(+)-Glutaminsäure	L(+)-Alanin	L-Prolin	Glimmer	Polyamid 6.6
Dibenz(c,h)acridin	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Dibenz(a,j)acridin	-	-	-	-	-	+	-	-	+		
7-Methylbenz(a)anthracen	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
12-Methylbenz(a)anthracen	-	-	-	-	-	+	-	-	+		
Benzo(a)pyren	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Chrysen	-	-	-	-	-	+	-	-	+		
L-Prolin										+	+
Glycin										+	+

Mikroskopische Aufnahmen der beobachteten Epitaxieerscheinungen sind in den Abbildungen 3 - 12 wiedergegeben. Die hier deutlich erkennbare gerichtete Kristallisation ist darauf zurückzuführen, daß die spezielle Grenzflächenstruktur der Unterlage eine Matrizenfunktion ausübt. Auf einer isotropen Grenzfläche dagegen (z.B. Glas ; siehe die Abbildungen 13 - 15) erfolgt die Adsorption und damit auch Kristallisation in ungeordneter Folge.

Die negativen Resultate mit den Kohlehydraten und mit den Aminosäuren Glutaminsäure und Alanin sind darauf zurückzuführen, daß kristallographische Analogien und/oder analoge Bindungsfelder fehlen.

Es muß betont werden, daß diese Epitaxie-Versuche keine Aussagen zulassen über die cancerogene Wirksamkeit einer Verbindung - z.B. Benzo(a)pyren, 7-Methylbenz(a)anthracen und Dibenz(c,h)acridin zeigten keine Orientierungen auf Aminosäuren -, sondern daß die positiven Resultate mit den beiden Aminosäuren Glycin und Prolin uns lediglich vermuten lassen, daß grundsätzlich auch Proteine orientiert adsorbiert werden können. Diese Vermutung wird durch die im folgenden beschriebenen positiven Ergebnisse von Adsorptionsversuchen gestützt.

Abb. 3 Orientierte Aufwachsung von 12-Methylbenz(a)anthracen auf Glycin (Vergr. 500 x ; gekr.N.)

Abb. 4 Orientierte Aufwachsung von 12-Methylbenz(a)anthracen auf L-Prolin (Monohydrat). (Vergr. 250 x ; gekr.N.)

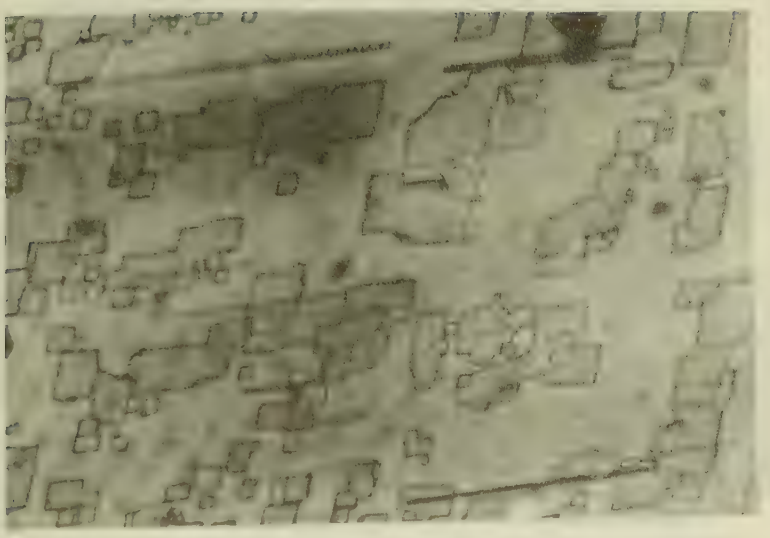


Abb. 5 Orientierte Aufwachsung von Chrysen auf Glycin
(Vergr. 500 x)

Abb. 6 Orientierte Aufwachsung von Chrysen auf L-Prolin (Monohydrat)
(Vergr. 250 x ; gekr.N.)

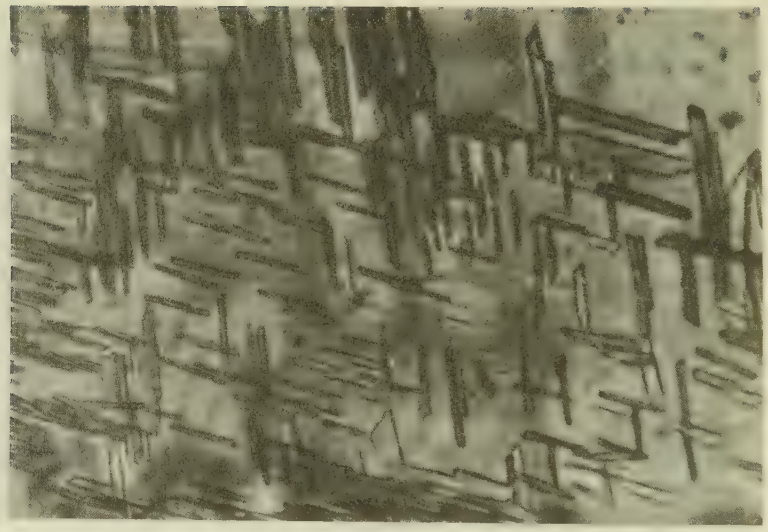


Abb. 7 Orientierte Aufwachsung von Dibenz(a,j)acridin auf Glycin (Vergr. 100 x)

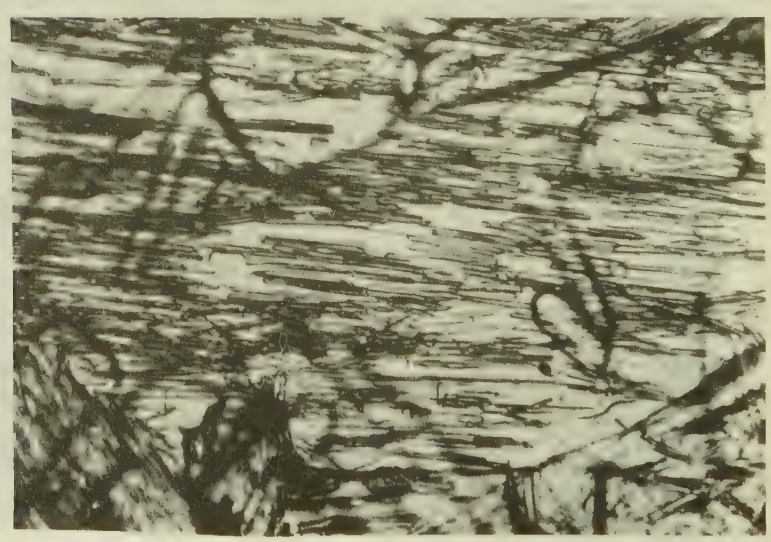


Abb. 8 Orientierte Aufwachsung von Dibenz(a,j)acridin auf L-Prolin (Monohydrat) (Vergr. 250 x)

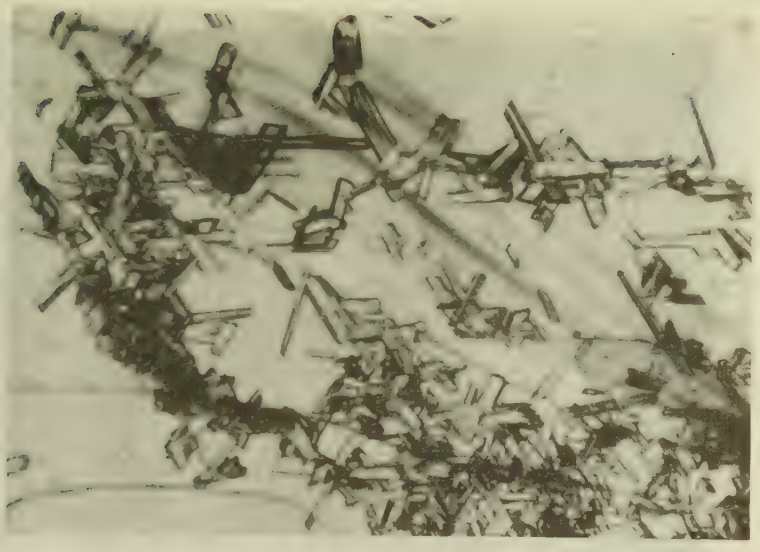


Abb. 9 Orientierte Aufwachsung von Glycin auf Glimmer (Vergr. 250 x)

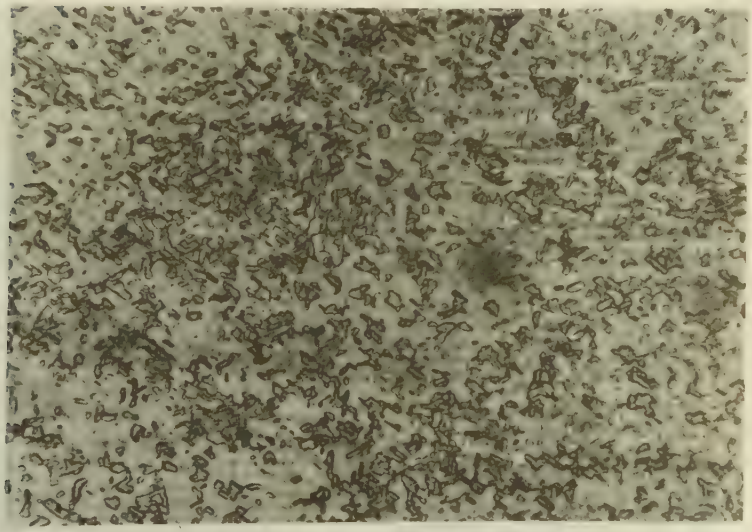


Abb. 10 Orientierte Aufwachsung von L-Prolin auf Glimmer (Vergr. 250 x)

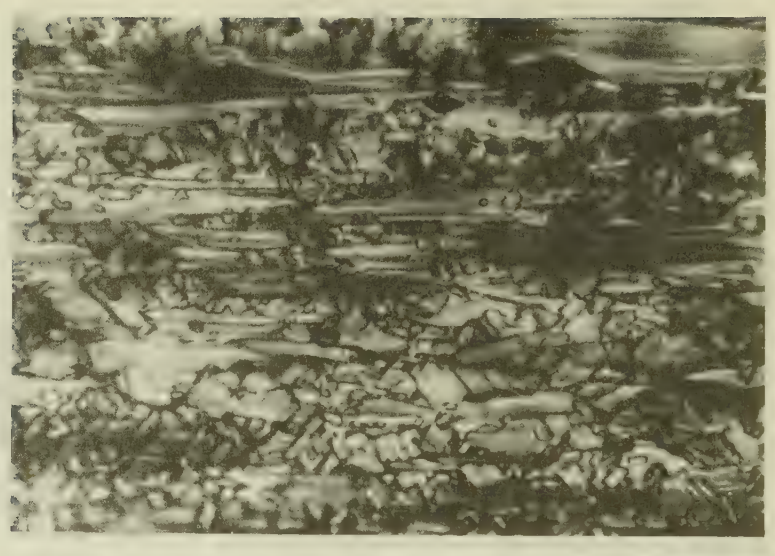


Abb. 11 Orientierte Aufwachsung von Glycin auf Polyamid 6.6 (Längsschnitt eines gereckten Drahtes) (Vergr. 800 x)
Orientierung der Faser: ⟷
Orientierung der Glycin-Kristalle: \ /

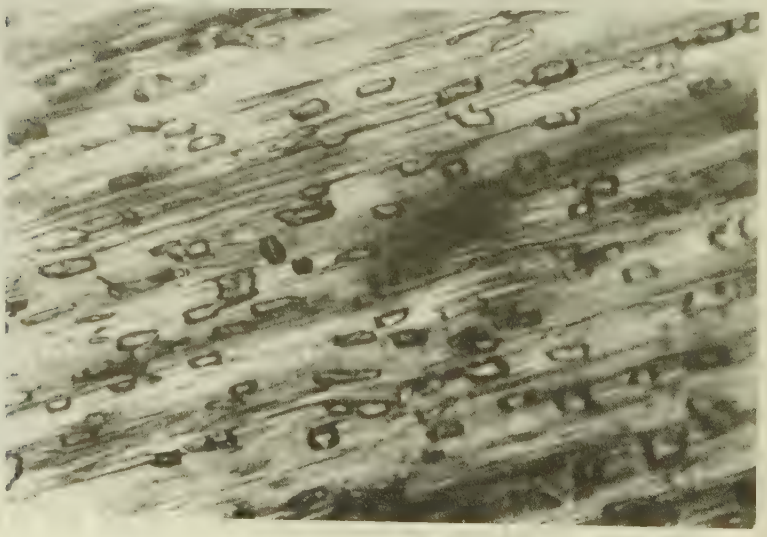


Abb. 12 Orientierte Aufwachsung von L-Prolin auf Polyamid 6.6 (Vergr. 500 x). Faserrichtung: ⟷

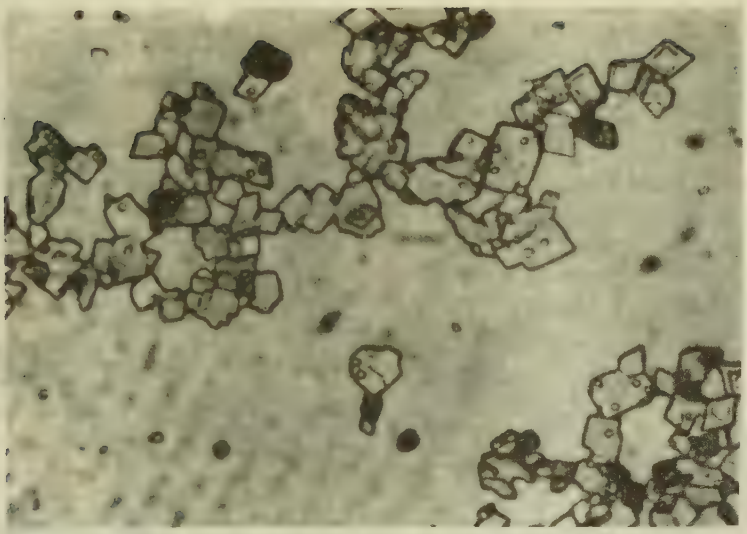


Abb. 13 Chrysen auf Glas (Vergr. 500 x)

Abb. 14 12-Methylbenz(a)anthracen auf Glas
(Vergr. 250 x ; gekr.N.)

Abb. 15 Dibenz(a,j)acridin auf Glas (Vergr. 250 x)

B. Adsorption der Ribonuclease

Aus den Folgerungen der Matrizentheorie ergeben sich Hinweise für strukturelle Merkmale des biogenen Partners bei der Primärreaktion der Cancerogenese. Dieser biogene Reaktionspartner sollte eine mit der abgeleiteten speziellen Matrize korrespondierende Struktur aufweisen. Die spezifische Adsorption sollte zu einer Funktionsstörung im Zellstoffwechsel führen. Nicht zuletzt wegen der positiven Epitaxie-Versuche mit Aminosäuren nehmen wir an, daß es sich bei dem Reaktionspartner um ein Protein - speziell um ein Enzym - handelt.

Bei der Überprüfung bekannter Enzymstrukturen fiel uns auf, daß die Ribonuclease in ihren Molekülabmessungen mit der abgeleiteten zweidimensionalen Matrize korrespondiert.

Moleküldimensionen: 22 Å (18) x 28 Å (3 x 7,33) x 38 Å (4 x 7,0)

Es schien uns nach dieser Feststellung sinnvoll, das Adsorptionsverhalten der Ribonuclease gegenüber kristallinen Cancerogenen zu untersuchen.

1. Material und Methode

Die Aktivität der Ribonuclease nach einstündiger Inkubation mit kristallinen Cancerogenen wurde nach einem von R.SHAPIRA (37) angegebenen Verfahren bestimmt. Bei dieser Methode wird die Extinktionsabnahme einer RNS-haltigen Thionin-Lösung bei 623 nm verfolgt. Die Geschwindigkeit der Extinktionsabnahme ist ein Maß für die Enzym-Aktivität.

a) Enzymlösung: Ribonuclease (Pankreas) 20 U/mg (Fa. Merck). 12 mg in 1 Liter Phosphatpuffer pH 6,88
b) Bezugslösung: 10 mg Thionin in 670 ml Phosphatpuffer pH 6,88
c) Testlösung: 30 mg Ribonucleinsäure (Fa. Fluka AG) in 120 ml Bezugslösung.

5 mg der im Achatmörser pulverisierten Testsubstanz wurden mit 2,5 ml Enzymlösung und 4 Glaskugeln (5 mm ∅) in einem

Röhrchen aus Polyäthylen 1 Stunde lang bei 25° C kräftig geschüttelt und anschließend filtriert. Zu 3 ml Testlösung wurden 0,25 ml des Filtrats gegeben und die Extinktion bei 623 nm gegen die Bezugslösung gemessen (25° C / Photometer Eppendorf).

2. Ergebnisse

Die beobachteten Extinktionsänderungen (ΔE) gegenüber der Zeit (t) sind in der Abbildung 16 dargestellt.
Die eingetragenen Meßpunkte sind Mittelwerte aus mindestens drei Meßreihen. Trotz der relativ großen Streuung bis maximal 20 % ist unverkennbar, daß die stark wirksamen Cancerogene sich durch eine große Adsorptionskraft auszeichnen.

Obwohl die Matrizentheorie zunächst nur für l o k a l wirkende, wasserunlösliche Cancerogene abgeleitet wurde, führten wir auch entsprechende Versuche mit einigen r e s o r p t i v wirkenden aromatischen Aminen durch. Die cancerogene Wirksamkeit dieser Verbindungen hängt bekanntlich - wie bei den Kohlenwasserstoffen - unter anderem von ihren Molekül-dimensionen ab. Unsere Vermutung, daß auch hier eine Adsorption von Ribonuclease stattfinden kann, wurde bestätigt.
Die Adsorptionskraft von Dimethylgelb, NN-Dimethyl-4-biphenylamin und N-Fluoren-2-yl-acetamid war bei gleichen Konzentrationsverhältnissen schwächer als die der stark cancerogenen Kohlenwasserstoffe und lag im Bereich zwischen der von Perylen und Phenanthren.

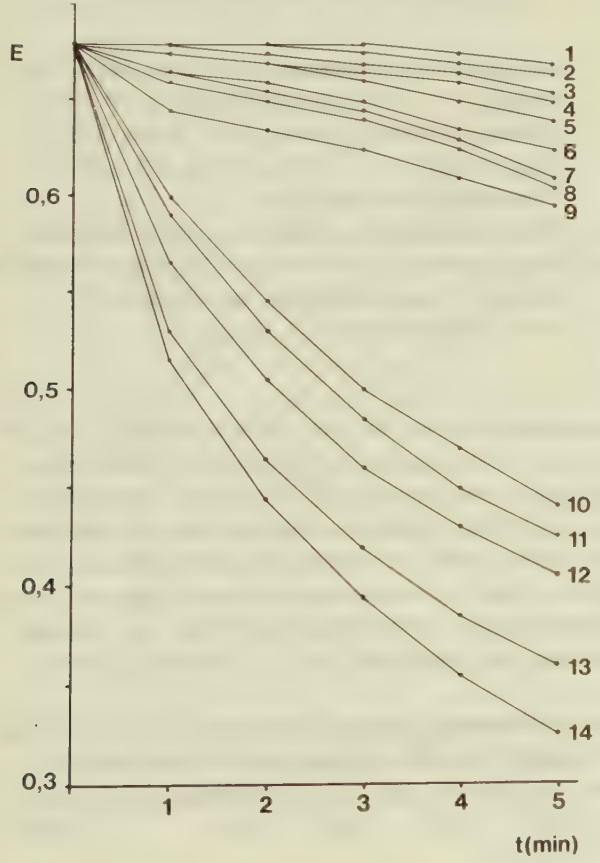
Abb. 16 : Aktivität der Ribonuclease nach Adsorption an kristallinen Cancerogenen.

Extinktion einer RNS-haltigen Thioninlösung bei 623 nm in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

1 = Dibenz(a,h)anthracen
2 = Benzo(a)pyren
3 = 3-Methylcholanthren
4 = 7,10-Dimethyl-benz(a)anthracen
5 = 7-Methyl-benz(a)anthracen
} stark cancerogen

6 = Coronen
7 = Chrysen
8 = Anthracen
9 = Perylen
10 = Nickel-Pulver
11 = Phenanthren
12 = Asbest
13 = Quarz
} schwach oder nicht cancerogen

14 = ohne Inhibitor



C. Hemmung der Ribonuclease-Aktivität durch Adsorption an Cancerogenen

In einem weiteren Versuch war zu klären, ob durch die in den vorangegangenen Versuchen festgestellte Adsorption eine Hemmung der Enzymaktivität hervorgerufen wird, und wenn ja, um welche Art der Hemmung es sich handelt.

1. Material und Methode

Die Aktivität der Ribonuclease in Gegenwart der Adsorbentien wurde in Abhängigkeit vom Substratgehalt durch Bestimmung der säurelöslichen Purin- und Pyrimidin-Derivate gemessen.

Reagentien:

a) Enzym: Ribonuclease (Pankreas) 20 U/mg (Fa. Merck) 12 mg in 1 Liter Phosphatpuffer pH 6,88

b) Substrat: Ribonucleinsäure, purum (Fa. Fluka AG) 5 mg (6,6 , 10 , 20 , 40 mg) in 10 ml Phosphatpuffer pH 6,88

c) Adsorbentien: Benz(a)anthracen, Chrysen, Benzo(a)pyren

d) Fällungsmittel: Uranylacetat, 0,75 %ig in 25 %iger Perchlorsäure (nach ANFINSEN und Mitarb.(1))

e) Gerät: U V - Spektrometer (Zeiss)

Ausführung:

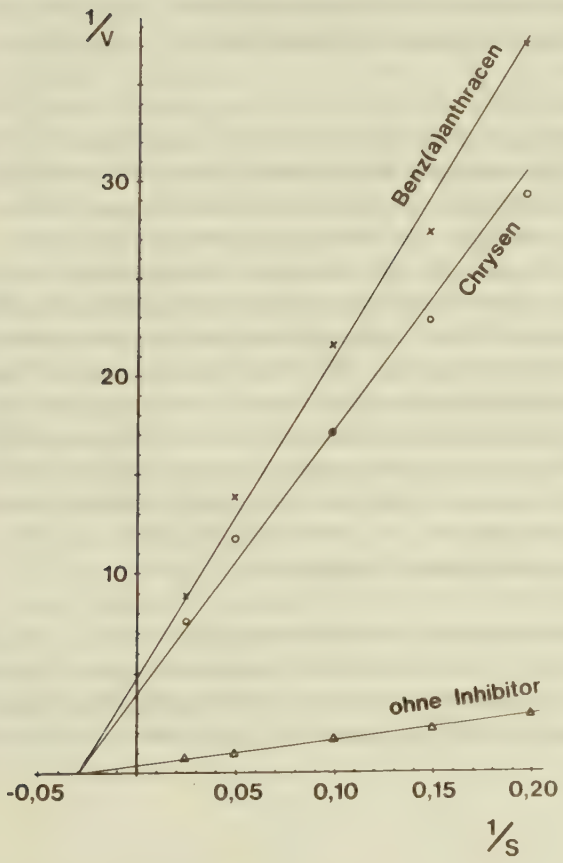
5 mg des im Achatmörser pulverisierten Adsorbens und 1 ml Enzymlösung wurden mit 3 Glaskugeln (5 mm ∅) in einem Röhrchen aus Polyäthylen 1 Stunde bei 25° C kräftig geschüttelt. Nach Zugabe von 10 ml RNS - Lösung wurde weitere 10 Minuten geschüttelt und anschließend die Reaktion durch Fällung der RNS mit Hilfe von 2,5 ml Uranylacetat in Perchlorsäure unterbrochen. Der Niederschlag wurde abfiltriert und die Extinktion nach Verdünnung mit Aqua dest. (1 : 20) bei 260 nm gemessen.

Der Nullwert wurde mit einer Lösung eingestellt, bei der die Reihenfolge der Zugabe von RNS- Lösung und Fällungsmittel vertauscht wurde, die sonst aber gleiche Mengen aller Reagentien enthielt.

2. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Hemmversuche mit Benz(a)anthracen und Chrysen sind im Lineweaver - Burk - Diagramm dargestellt. Der Kurvenverlauf zeigt, daß es sich hier um eine n i c h t k o m p e t i t i v e H e m m u n g der Enzymaktivität handelt. Versuche mit Benzo(a)pyren erbrachten unter gleichen Konzentrationsverhältnissen eine vollständige Hemmung des Enzyms.

Abb. 17 : Lineweaver-Burk-Diagramm der Ribonuclease-Hemmung durch Adsorption an kristallinem Chrysen und Benz(a)anthracen.
V = Extinktion bei 260 nm, nach einer Reaktionszeit von 10 Min.
S = Substratkonzentration [mg]



IV. DISKUSSION

Im ersten Teil der Untersuchungen konnte die Vorstellung veranschaulicht werden, daß biogene Stoffe spezifisch - auf Grund einer Matrizenfunktion des Adsorbens - an den Festkörpergrenzflächen von Cancerogenen adsorbiert werden können. Wir wählten für unsere Versuche Aminosäuren und Zucker, da diese Stoffe gut kristallisieren. Makromolekulare Stoffe, wie sie für die Primärreaktion der Krebsentstehung in Frage kommen, lassen sich für derartige Versuche kaum verwenden, da Kristalle nur in Ausnahmefällen und schwer zu erhalten sind. Für die bei unseren Adsorptionsversuchen im zweiten Teil unserer Arbeit verwendete Ribonuclease werden in der Literatur Möglichkeiten der Kristallzüchtung beschrieben (19). Wir jedoch konnten ausreichend gut ausgebildete Kristalle leider noch nicht erhalten.

Die aus den Folgerungen der Matrizentheorie abgeleitete Vermutung, daß die Ribonuclease von kristallinen Cancerogenen adsorbiert wird, wurde durch die Adsorptionsversuche bestätigt. Über die Spezifität der Adsorption kann leider noch nichts ausgesagt werden, da bisher weder eine Epitaxie zwischen Ribonuclease und Cancerogen nachgewiesen werden konnte, noch andere Enzyme in ihrem Adsorptionsverhalten gegenüber Cancerogenen untersucht wurden. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen stellen jedoch eindeutig sicher, daß eine Inhibierung von Enzymen auf Grund einer Adsorption in vivo stattfinden kann. Es ist deshalb nicht ausgeschlossen, daß die Primärwirkung der verschiedenartigsten wasserunlöslichen Cancerogene - Kohlenwasserstoffe, Kunststoffe, Silikate und Metalle - auf einem gemeinsamen Mechanismus beruht.

Unter dieser Vorraussetzung ergeben sich Hinweise für den Ort der Primärreaktion. Da es unter diesen genannten Cancerogenen Stoffe gibt, die mit Sicherheit nicht intracellular reagieren - z.B. Asbest und Kunststoff - muß der Reaktionsort außerhalb

der Zelle bzw. an der äußeren Zellmembran zu suchen sein. Plasmamembrangebundene Ribonuclease haben P.EMMELOT und Mitarb. (10) an Leberzellen von Ratten, R.E.BASES und J.HUPPERT (2) und S.T.CROOKE und Mitarb. (3) an Aszites-Tumor-Zellen nachgewiesen.

Die Ribonucleasen-Aktivität in Tumoren wurde mehrfach untersucht (4,38-41). Interessanterweise stellten die Autoren übereinstimmend fest, daß das Parenchym der untersuchten Tumoren keine Ribonucleasen-Aktivität zeigte.
DAOUST (5) berichtete kürzlich über eine Abnahme der Ribonucleasen-Aktivität im Leberparenchym von Ratten, die mit Dimethylgelb bzw. dem 3'-Methyl-Derivat gefüttert wurden. Dieser Aktivitätsverlust trat herdförmig auf,und aus diesen Herden entwickelten sich später Hepatome. Diese Feststellung und die Ergebnisse unserer Adsorptionsversuche mit den verschiedenartigsten Cancerogenen, einschließlich resorptiv wirkender aromatischer Amine, bekräftigen unsere Auffassung, daß die Primärreaktion der Cancerogenese durch diese Verbindungen eine Inaktivierung von Enzymen, speziell von Nucleasen, darstellt.

Unter der Annahme, daß einer Ribonuclease-Hemmung die entscheidende Bedeutung bei der Primärreaktion der Cancerogenese zukommt, können wir uns den Mechanismus derart vorstellen, daß der Schutz der Zelle gegen RNS - Tumorviren durch die Enzymadsorption und -inhibierung geschwächt bzw. aufgehoben wird. Einen Infektionsschutz gegenüber der RNS von E M C - Viren durch plasmamembrangebundene Ribonuclease konnten BASES und HUPPERT (2) nachweisen.

Die Feststellung, daß es sich bei der Adsorption um eine nichtkompetitive Hemmung der Ribonuclease handelt, läßt vermuten, daß die Adsorption des Enzymmoleküls zu einer Positionsänderung der katalytischen Reste im aktiven Zentrum führt, und so das Enzym inaktiviert wird.

Durch die Tatsache, daß die stark wirksamen Cancerogene auch über eine besonders starke Adsorptionskraft verfügen, wird unsere Theorie über den Wirkungsmechanismus in prägnanter Weise gestützt. Die Adsorptionsstärke mag unter anderem bei den Kohlenwasserstoffen auf die π -Elektronendichte der sogenannten " K - Region " zurückzuführen sein, die seit langem für die cancerogene Wirkungsstärke dieser Verbindungen verantwortlich gemacht wird (13,27-30,32,33). In auffallender Weise sind bei den bisher bekannt gewordenen Kristallstrukturen von Benzo(a)pyren (14), 3-Methylcholanthren (15), 7,12-Dimethyl-benz(a)anthracen (16) und Dibenz(a,h)anthracen (31) die Matrizenflächen mit Atomen der " K - Region " besetzt.

Die Wirkungsstärke muß der Theorie nach von allen Faktoren beeinflußt werden können, die das Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption verändern. Die Größe der Matrizenfläche kann z.B. durch konkurrierende Adsorption anderer Gewebsbestandteile verringert, dagegen durch Neubildung von Matrizenflächen infolge intermittierender Lösungs- und Kristallisationsprozesse erweitert werden. Die von mehreren Autoren [zusammenfassende Darstellung bei L.W.WATTENBERG (42)] festgestellte Hemmung der Wirkung eines starken Cancerogens durch eine beigemischte bzw. bis zu vier Tagen später verabfolgte schwach cancerogene strukturverwandte Verbindung könnte in einer Blockierung der wirksamen Matrizenfläche begründet sein.

Die Kausaltheorie der Silikose von SEIFERT erfährt durch unsere Ergebnisse eine weitere Stütze. Silikose und Krebs erscheinen nach der Matrizentheorie in einem ursächlichen zusammenhang.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ribonuclease wird in vitro von kristallinen Cancerogenen (Kohlenwasserstoffe, Silikate, Metalle) unter Inhibierung adsorbiert.
In auffallender Weise zeichnen sich stark wirksame Cancerogene durch eine große Adsorptionskraft aus.
Nach der Matrizentheorie von B.CONTAG handelt es sich um eine strukturgelenkte spezifische Adsorption an den Festkörpergrenzflächen der Cancerogene.
Die Hemmung der Ribonuclease-Aktivität ist nichtkompetitiv.

Über die Bedeutung dieser beobachteten Enzymhemmung für die Krebsentstehung kann zunächst noch nichts Definitives gesagt werden, da noch keine weiteren Enzyme untersucht wurden. Denkbar ist jedoch, daß durch die Adsorption und Inhibierung membrangebundener Ribonuclease der Infektionsschutz der Zelle gegenüber RNS-Tumor-Viren geschwächt bzw. aufgehoben wird.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1 ANFINSEN,C.B., R.R.REDFIELD, W.L.CHOATE, J.PAGE, W.R.CARROLL: Studies on the gross structure, cross-linkages, and terminal sequences in ribonuclease. J. biol. Ch. 207 (1954) 201

2 BASES,R.E., J.HUPPERT: Impairment of EMC Viral Infectivity by Cell-Associated Ribonuclease. Virol. 29 (1966) 596

3 CROOKE,S.T., S.OKADA, H.BUSCH: A Surface 3'-Exonuclease of Novikoff Hepatoma Ascites Cells. Cancer Research 32 (1972) 1745

4 DAOUST,R., H.AMANO: Ribonuclease and Deoxyribonuclease Activities in Experimental and Human Tumors by the Histochemical Substrate Film Method. Cancer Research 23 (1963) 131

5 DAOUST,R.: Focal Loss of Ribonuclease Activity in Preneoplastic Rat Liver. Cancer Research 32 (1972)2502

6 DRUCKREY,H., D.SCHMÄHL: Cancerogene Wirkung von Kunststoff-Folien. Z. Naturforschg. 7b (1952) 353

7 DRUCKREY,H., D.SCHMÄHL: Cancerogene Wirkung von Polyäthylen-Folien an Ratten. Z.Naturforschg. 9b (1954) 529

8 DRUCKREY,H., D.SCHMÄHL: Cancerogene Wirkung von Quarz bei Implantation an Ratten. Naturwiss. 41 (1954)534

9 DRUCKREY,H.: Fortpflanzung und Wachstum. In: Flaschenträger/Lehnartz: Physiol. Chemie II (1959)

10 EMMELOT,P., C.J.BOS, E.L.BENEDETTI, P.RÜMKE: Studies on Plasma Membranes. Biochim. Biophys. Acta 90 (1964) 126

11 GROSSE,H.: Silikose und Lungenkrebs. Arch. Gewerbepath. 14 (1956) 357

12 HENDRY,J.A., F.L.ROSE, A.L.WALPOLE, R.F.HOMER: Bis-Epoxides/Ethyleneimines as cytotoxic agents. Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy 6 (1951) 235/357

13 HOFFMANN,F.: LCAO-MO-SCF-Indices chemischer Reaktionsfähigkeit und krebserzeugende Eigenschaft polyzyklischer Kohlenwasserstoffe. Theoret. chim. Acta (Berl.) 15 (1969) 393

14 IBALL,J.: The Crystal Structure of condensed Ring CompoundsII Z. Krist. 94 (1936) 7

15 IBALL,J., S.G.G.MAC DONALD: The crystal structure of 20-methylcholanthrene. Z. Krist. 114 (1960) 439

16 IBALL,J.: A Refinement of the Structure of 9:10-Dimethyl-1:2-benzanthracene. Nature 201 (1964) 916

17 KAHLAU,G.: Der Lungenkrebs. Erg. Path. 37 (1954) 258

18 KARTHA,G., J.BELLO, D.HARKER: Tertiary structure of ribonuclease. Nature 213 (1967) 862

19 KUNITZ,M.: Crystalline ribonuclease. J. gen. Physiol. 24 (1940) 15

20 MÜLLER-BUSCHMANN,B.: Epitaxie von Polyacrylnitril auf Quarz. Kolloid-Zeitschr. 205 (1965) 46

21 NOTHDURFT,H.: Die experimentelle Erzeugung von Sarkomen bei Ratten und Mäusen durch Implantation von Rundscheiben aus Gold,Platin oder Elfenbein. Naturwiss. 42 (1955) 75

22 NOTHDURFT,H.: Über die Sarkomauslösung durch Fremdkörperimplantation bei Ratten in Abhängogkeit von der Form der Implantate. Naturwiss. 42(1955)106

23 NOTHDURFT,H.: Tumorerzeugung durch Fremdkörperimplantation. Berlin. Symp. Carcinog. Akad. Verlag (1960) 80

24 NOTHDURFT,H.: Sarkomerzeugung bei Ratten durch implantierte Fremdkörper. Die Therapie des Monats 8 (1961)262

25 OPPENHEIMER,B.S., E.T.OPPENHEIMER, A.P.STOUT: Sarcomas Induced in Rats by Implanting Cellophane. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 67 (1948) 33

26 OPPENHEIMER,B.S., E.T.OPPENHEIMER, A.P.STOUT, I.DANISHEFSKY: Malignant Tumors Resulting from Embedding Plastics in Rodents. Science 118 (1953)305

27 PULLMANN,B., A.PULLMANN: "Les Theories électroniques de la Chemie organique" Masson, Paris (1952)

28 PULLMANN,A.: Structure électronique et activité cancérogène des hydrocarbures aromatiques. Bull. Soc. chim. (France) 21 (1954) 595

29 PULLMANN,A., B.PULLMANN: Electronic structure and carcinogenic activity of aromatic molecules; new developments. Adv. Cancer Res. 3 (1955) 117

30 PULLMANN,B., A.PULLMANN: Electron-Donor or Electron-Acceptor Properties and Carcinogenic Activity of Organic Molekules. Nature 199 (1963) 467

31 ROBERTSON,J.M., J.G.WHITE: The Crystal Structure of the Orthorhombic Modification of 1:2.5:6-Dibenzanthracene. A Quantitative X-Ray Investigation. J. Chem. Soc.(1947) 1001

32 SCHMIDT,O.: Die Charakterisierung der einfachen und Krebs erzeugenden aromatischen Kohlenwasserstoffe durch die Dichteverteilung bestimmter Valenzelektronen (B-Elektronen). Z. physik. Chemie 42 (1939) 83

33 SCHMIDT,O.: Charakterisierung und Mechanismus der Krebs erzeugenden Kohlenwasserstoffe. Naturwiss. 29 (1941) 146

34 SEIFERT,H.: Neue experimentelle Untersuchungen zur Grenzflächenaktivitätstheorie. In: Jötten,K.W., W. Klosterkötter (Hrsg.): Die Staublungenerkrankungen Bd.3 (Wiss.Forschungsber. 66). Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt (1958)

35 SEIFERT,H.: Gedanken und Experimente zu einer Kausaltheorie der Silikose. Beiträge Silikose-Forschung H.82 (1964)

36 SEIFERT,H.: "Strukturgelenkte Grenzflächenvorgänge in der unbelebten und belebten Natur." Verlag: Fr.Vieweg & Sohn, Braunschweig (1971)

37 SHAPIRA,R.: A Spectrophotometric Method for the Measurement of Ribonuclease Activity. Analyt. Biochem. 3 (1962) 308

38 STEIGLEDER,G.K., I.FISCHER: Über die Lokalisation von Ribonuclease (RNAse) und Deoxyribonuclease(DNAse) Aktivität in normaler, in entzündlich veränderter Haut und bei Hauttumoren. Arch.Klin.Exptl.Dermatol. 217 (1966) 553

39 TAPER,H.S.: L'Activité des Nucléases et Phosphatases Acides et Alcalines dans les Tumeurs Rénales Induites chez le Rat par la Dimethylnitrosamine (Etude Histochemique). Pathol. Europaea 2 (1967) 406

40 TAPER,H.S., J.M.BRUCHER, L.FORT: The Activity of Alkaline and Acid Nucleases in Tumors of the Human Central Nervous System (Histochemical Study). Cancer 28 (1971) 482

41 TAPER,H.S., L.FORT, J.M.BRUCHER: Histochemical Activity of Alkaline and Acid Nucleases in the Rat Liver Parenchyma during N-Nitrosomorpholine Carcinogenesis. Cancer Research 31 (1971) 913

42 WATTENBERG,L.W.: Chemoprophylaxis of Carcinogenesis:A Review. Cancer Research 26 (1966) 1520

Lebenslauf

Am 28. Januar 1944 wurde ich als Tochter des Technischen Betriebskaufmanns Gerhard Contag und seiner Ehefrau Mary, geb. Strothoff , in Halberstadt geboren. Seit Kriegsende lebe ich in Berlin. Von 1950 bis 1956 besuchte ich die 11. Grundschule in Berlin-Siemensstadt, anschließend die Carl - Friedrich - von - Siemens - Schule,Oberschule Wissenschaftlichen Zweiges, an der ich 1964 die Reifeprüfung ablegte. Im selben Jahr begann ich das Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin und bestand dort im Juni 1971 das medizinische Staatsexamen.
Ich bin seit 1969 mit dem Studenten Manfred Bogatu verheiratet. 1971 wurde unsere Tochter geboren.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr.-Ing.Bodo Contag, meinem Bruder. Ihm verdanke ich nicht nur die Anregung zu dieser Dissertation, sondern auch zahlreiche wertvolle Diskussionen.
Daneben bin ich insbesondere den Herren Professoren Dr.med.Dulce, Dr.med.Waldschmidt und Dr.phil.Newesely zu Dank verpflichtet. Für die Herstellung der photographischen Aufnahmen danke ich den Herren Dr.-Ing. Mücke und H.R. Schlöske.